

Method for producing an unmodified intravenous IgM- and/or IgA containing immunoglobulin preparation.

Publication number: EP0413187

Publication date: 1991-02-20

Inventor: KOTITSCHKE RONALD DR DIPL-CHEM (DE);
STEPHAN WOLFGANG DR DIPL-CHEM (DE);
MOELLER WOLFGANG DR DIPL-CHEM (DE);
PIECHACZEK DETLEF DR DIPL-CHEM (DE);
RUDNICK DIETER DR DIPL-CHEM (DE)

Applicant: BIOTEST PHARMA GMBH (DE)

Classification:

- international: C07K16/06; A61K38/00; C07K16/06; A61K38/00; (IPC1-7): A61K39/395

- european: C07K16/06A

Application number: EP19900114575 19900730

Priority number(s): DE19893927112 19890817

Also published as:

- US5075425 (A1)
- JP3083932 (A)
- EP0413187 (B1)
- DE3927112 (C1)

Cited documents:

- EP0013901
- US3808189
- EP0352500
- JP59170015
- JP1038657

[Report a data error here](#)

Abstract of EP0413187

A process for the preparation of an immunoglobulin solution which is suitable for intravenous administration from a protein fraction, containing immunoglobulins IgG, IgA and IgM in partially concentrated form, from human blood comprises the steps: mixing the protein fraction with acetate buffer, where appropriate removing insoluble constituents by filtration, treatment with calcium phosphate and octanoic acid, centrifugation, removal of the supernatant and treatment thereof with an adsorbent, removal of the adsorbent and sterilisation by filtration.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 413 187 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90114576.5

(51) Int. Cl. 5: **A61K 39/395**

(22) Anmeldetag: 30.07.90

(30) Priorität: 17.08.89 DE 3927112

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.02.91 Patentblatt 91/08

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BIOTEST PHARMA GMBH
Landsteiner Strasse 5
D-6072 Dreieich(DE)

(72) Erfinder: Kotitschke, Ronald, Dr. Dipl.-Chem.
Kleiststrasse 23
D-6072 Dreieich(DE)
Erfinder: Stephan, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem.
Philipp-Holzmann-Strasse 84
D-6072 Dreieich(DE)
Erfinder: Möller, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem.
Graf-von-Stauffenberg-Strasse 32
D-6370 Oberursel(DE)
Erfinder: Plechaczek, Detlef, Dr. Dipl.-Chem.
Darmstädter Strasse 54
D-6115 Münster(DE)
Erfinder: Rudnick, Dieter, Dr. Dipl.-Chem.
Freiherr-vom-Stein-Strasse 1
D-6072 Dreieich(DE)

(74) Vertreter: Beil, Hans Chr., Dr. et al
Beil, Wolff und Beil, Rechtsanwälte
Adelonstrasse 58 Postfach 80 01 40
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54) Verfahren zur Herstellung eines intravenös verabreichbaren IgG-, IgA- und IgM-haltigen Arzneimittels.

(57) Verfahren zur Herstellung einer für intravenöse Applikation geeignete Immunglobulinlösung aus einer der Immunglobuline IgG, IgA und IgM in ankonzentrierter Form enthaltenden Proteinfraktion von Humanblut mit den Verfahrensschritten: Versetzen der Proteinfraktion mit Acetatpuffer, gegebenenfalls Abfiltrieren unlöslicher Bestandteile, Behandeln mit Calciumphosphat und Octansäure, Zentrifugieren, Abtrennen des Überstandes und dessen Behandlung mit einem Adsorptionsmittel, Abtrennen des Adsorptionsmittels und Sterifiltration.

EP 0 413 187 A1

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES INTRAVENÖS VERABREICHBAREN IGG-, IGA- UND IGM-HALTIGEN ARZNEIMITTELS

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer für die intravenöse Applikation geeigneten Immunglobulinlösung durch Behandlung einer durch Fraktionierung aus Humanblut erhaltenen Proteinfraktion, die die Immunglobuline des Typs IgG, IgA und IgM in ankonzentrierter Form enthält.

In der EP 0 013 901 ist ein Verfahren zur Herstellung einer intravenös anwendbaren IgM-haltigen Proteinlösung beschrieben, bei dem eine durch Fraktionierung aus Blutplasma oder Serum erhaltene Proteinfraktion (wie z.B. eine Cohn-Fraktion III) durch Behandlung mit kolloidaler Kieselsäure von Lipiden befreit, mit Diethylaminoethyl-Gruppen tragenden, quervernetzten Dextranen oder Cellulose, vorzugsweise DEAE-Sephadex A 50, behandelt und dann mit β -Propiolacton bei Temperaturen von 20 bis 37° C und pH-Werten von 7.0 bis 8.5 für die Dauer von 2 bis 10 Stunden bis zur pH-Konstanz behandelt wird. Die Cohn-Fraktion III enthält neben den gewünschten Immunglobulinen erhebliche Mengen von denaturiertem Protein, Lipide und viele Proteasen. Für die intravenöse Unverträglichkeit der Cohn-Fraktion III sind IgG-Polymeren sowie die Proteasen mit hohen proteolytischen Aktivitäten und andere denaturierte Proteine verantwortlich. Die in EP 0 013 901 verwendete kolloidale Kieselsäure ist ein geeignetes Mittel zur Entfernung von Lipiden, führt jedoch zu Kontaktaktivierungen der Gerinnungsfaktoren und erhöht somit zusätzlich die in der Cohn-Fraktion III enthaltenen Mengen an proteolytisch wirksamen Proteinen. Die Adsorption dieser Proteasen macht daher im Verfahren der EP 0 013 901 die Verwendung eines Anionenaustauschers vom Typ DEAE-Sephadex A 50 erforderlich. Bei unspezifischen Aktivierungen von Proteasen ist eine sichere quantitative Entfernung dieser Proteasen häufig nur durch die Verwendung unverhältnismäßig großer Mengen des entsprechenden Adsorbens möglich. Es ist auch nicht auszuschließen, daß bei Kontaktaktivierungen der Proteine des Gerinnungssystems und des Kiniensystems proteolytische Aktivitäten freigesetzt werden, die nicht an Anionenaustauscher binden.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung einer sterilen und intravenös anwendbaren Lösung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM unter Verwendung der Cohn-Fraktion III oder einer durch Fraktionierung aus Blutplasma oder Serum erhaltenen Proteinfraktion zu finden, die die Immunglobuline in angereicherter Form enthält.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß man zur Herstellung einer intravenös anwendbaren Lösung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM auf die Entfernung der Lipide aus der Cohn-Fraktion III durch die Adsorption an kolloidaler Kieselsäure verzichten kann. Die Abbildung I (Anhang) zeigt schematisch das erfindungsgemäße Verfahren, in Abbildung II (Anhang) ist eine Variante dargestellt.

Die Aufarbeitung der Cohn-Fraktion III gemäß der EP 0 013 901 führt zu einer intravenös verträglichen Lösung, die die Immunglobuline in folgender Mengenverteilung enthält: IgG: 4000 mg %; IgA: 500 mg % und IgM: 500 mg %, bei einem Gesamtproteingehalt von 5 g %. Das Verhältnis von IgG zu IgM in diesem Präparat beträgt also 8 : 1. Als wirksamer Bestandteil dieses Produktes bei der Behandlung bakterieller Infektionen ist nicht nur das IgM-Molekül beteiligt, sondern auch das im Produkt enthaltene IgG.

Humanes IgG besteht aus vier Subklassen (IgG-1, IgG-2, IgG-3 und IgG-4) mit unterschiedlichen chemischen und biologischen Eigenschaften. Nach einem primären Kontakt mit Bakterien werden zuerst Antikörper vom IgM-Typ produziert, die die Bakterien zur Agglutination bringen und schließlich eine Komplement-abhängige Lysis bewirken. Die später auftretenden IgG-Antikörper, die normalerweise eine höhere Affinität zum Antigen besitzen, abhängig von der IgG-Subklasse, induzieren eine Fc-Rezeptor-abhängige Phagozytose oder Zerstörung via Komplement (F. Shakib, Derby: Basic and Clinical Aspects of IgG-Subclasses; in Monographs in Allergy, Vol. 19 (1986), Karger).

Die IgG-Subklassen-Verteilung nach bakteriellen Infektionen ist in einigen Studien untersucht worden, hauptsächlich jedoch nach Vaccinationen. Die Zuordnung bestimmter Antikörperaktivitäten zu bestimmten IgG-Subklassen ist heute noch ein Feld wissenschaftlicher Forschung. Solange die Zuordnung jedoch nicht möglich ist, ist es wünschenswert, in IgG-haltigen Immunglobulinpräparaten eine IgG-Subklassenverteilung zu erreichen, die möglichst derjenigen eines normalen Poolplasmas entspricht.

Die Tabelle I (Anhang) zeigt, daß die Verwendung von kolloidalen Kieselsäure während der Herstellung von IgG-haltigen Immunglobulinpräparaten zu einer Abreicherung bis hin zum Verlust der IgG-Subklasse 3 führt.

Die Bestimmung der Immunglobulin-Konzentration erfolgte mit folgenden verschiedenen Methoden: Die Mancini-Technik mit Partigenplatten[®] der Behringwerke und Quantiplate[®] von Kallestad und dem Nephelometer Auto ICS II von Beckmann. Referenzmaterial für IgG, IgA und IgM war der WHO-Standard 67/88, in dem 100 IU/ml enthalten waren. Die IgG-Subklassen wurden mit der radialen Immundiffusion auf Agarose-Platten, unter Verwendung polyclonaler Subklassen-Antiseren (Schaf) bestimmt (Fa. Janssen). Als

Referenzserum diente der für die Immunglobulin-Bestimmung WHO-Referenzserumpool, da bis heute kein offizieller WHO-Standard für die IgG-Subklassen-Bestimmung vorhanden ist. Die Gesamtlipide wurden mit Reagenzien von der Fa. E. Merck bestimmt. Die Proteinlösung wurde mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt und anschließend mit Phosphorsäure-Vanillin-Reagenz umgesetzt.

6 Die Verwendung von kolloidalen Kieselsäure in einer Konzentration von 3% Aerosil gemäß der EP 0 013 901 führt zu der Abreicherung unerwünschter Lipide, bewirkt aber ebenfalls den Verlust der IgG-Subklasse 3.

10 Die Eigenschaft der kolloidalen Kieselsäure, die IgG-Subklasse 3 bevorzugt aus Proteinlösungen zu adsorbieren, betrifft nicht nur, wie in Tab. I aufgeführt, bereits hochgereinigte IgG-Lösungen, sondern trifft generell auf IgG-haltige Proteinlösungen zu (Tab. II, Anhang).

Das erfindungsgemäße Produkt enthält die IgG-Subklasse 3 in einer Konzentration, die einem Normalserumpool entspricht, während einem mit 3% Aerosil[®] (AE)-behandelten Präparat die IgG-Subklasse 3 fehlt, wie in der folgenden Tab. III dargestellt ist.

15

Tab. III

20

IgG-Subklassenverteilung in %				
	IgG-1	IgG-2	IgG-3	IgG-4
IgG ohne AE-Behandlung	58.8	28.1	3.7	9.4
IgG mit AE-Behandlung	61.2	29.5	0.1	9.2
Normalserum IgG*	70-60	25-27	2.4-4.6	1.6-7.5

25

* Geigy Tabelle (1979) 125

30

Blutplasmafraktionen haben ein hohes Risiko infektiös zu sein. Dieses Risiko betrifft besonders die Übertragung der Hepatitis B und Hepatitis Non-A/Non-B und in jüngster Zeit der HIV (human immunodeficiency virus). Da es durch diagnostische Maßnahmen nicht gelingt, hepatissichere Blutprodukte aus Plasmapools herzustellen, sind verschiedene Verfahren zur Sterilisation von Blutbestandteilen entwickelt worden. Die Pasteurisierung (10 h, 60 °C) wird erfolgreich für Albumin verwendet und ist durch die Verwendung von Stabilisatoren, wie Aminosäuren und Mono- bzw. Oligosacchariden und Zuckeralkoholen seit einigen Jahren auch zur Sterilisation empfindlicher Plasmaproteine wie den Gerinnungsfaktoren II, VIII und XIII beschrieben worden (EP 0 018 581). Die Wirksamkeit der Pasteurisation in Gegenwart dieser Stabilisatoren ist noch nicht abzuschätzen und wird zur Zeit überprüft. Die Erhitzung von Immunglobulinen für 10 Minuten auf 63 °C führt zu einer drastischen Zunahme ihrer antikomplementären Aktivität, so daß die Pasteurisation zur Sterilisation der Immunglobuline ungeeignet ist (R. van Furth, A. G. P. Braat, P. C. J. Leijh, A. Gardi: Opsonic and physicochemical characteristics of intravenous immunglobulin preparations. Vox Sang. 53: 70 - 75 (1987)).

35

40 Die Notwendigkeit, auch Immunglobulinpräparate einer Sterilisationsmaßnahme zu unterziehen, ergibt sich aus einer Reihe von Publikationen aus jüngster Zeit, in denen die Übertragung der Hepatitis B und Non-A/Non-B-Hepatitis durch intravenöse Immunglobulinpräparate beschrieben worden ist:

45

Björkander, J., Cunningham-Rundles, C., Lundin, P., Söderström, R., Hanson, L. A. (1988): Intravenous immunglobulin prophylaxis causing liver damage in 16 of 77 patients with hypogammaglobulinemia of IgG subclass deficiency. Am. J. Med. 84: 107-111.

50

John, J. T., Ninan, G. T., Rajagopalan, M. S., John, F. et al (1979): Epidemic hepatitis B caused by commercial human immunglobulin. Lancet I:1074.

Lever, A.M.L., Webster, A.V.D., Brown, D., Thomas H.C. (1984): Non-A, non-B hepatitis occurring in gammaglobulinaemic patients after intravenous immunoglobulin. Lancet II:1062-1064.

55

Lockner, D., Bratt, G., Lindborg, A., Törnebohm, E. (1987): Acute unidentified hepatitis in a hypogammaglobulinaemic patient on intravenous gammaglobulin successfully treated with interferon. Acta. Med. Scand. 221:413-415.

Williams, P. E., Yap, P. L., Gillon, J. Crawford, R. J., Galea, G., Cuthbertson, B. (1988). Non-A, non-B hepatitis transmission by intravenous immunoglobulin. Lancet II:501.

60

Die von LoGrippo beschriebene Methode der Kaltsterilisation besteht in der kombinierten Behandlung von Humanplasma mit β -Propiolacton und UV-Bestrahlung (LoGrippo, G. A. u. Hayashi, H.: Henry Ford Hosp. Med. J. 21 (1973), 181; LoGrippo, G. A. und Hartmann, F. W.: Bibl. Haematol. 7 (1958), 225).

Die von LoGrippo publizierten Daten zeigen, daß nur die Kombination von β -Propiolacton mit der UV-

Bestrahlung zu virussicheren Plasmen geführt hat (LoGrippo, G. A.: A ten year clinical study of plasma treated with Betaprone and combined Betaprone plus ultraviolet irradiation. Pacific Medicine and Surgery 72 (1964) 298-302).

5 In der EP 0 013 901 wird β -Propiolacton zur Behandlung einer IgM-haltigen Proteinlösung zur Herstellung einer intravenös applizierbaren Immunglobulinlösung verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt bereits ohne β -Propiolactonbehandlung zu einer mit IgM angereicherten Immunglobulinlösung, deren antikomplementäre Aktivität ca. 600 CH 50/g Protein beträgt. Durch eine zusätzliche Behandlung mit β -Propiolacton oder Tri-N-Butylphosphat kann eine Virusübertragung durch dieses Produkt ausgeschlossen werden. Es genügt also die alleinige Behandlung der Immunglobulinlösung mit β -Propiolacton ohne zusätzliche UV-Bestrahlung, um auch eine Übertragung der Hepatitis Non-A/Non-B sicher auszuschließen, wie in einem Experiment am Schimpanse gezeigt werden konnte.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen dem Verfahren der EP 0 013 901 und dem erfindungsgemäßen Verfahren betrifft die Adsorption mit einem Anionenaustauscher. In der EP 0 013 901 wird die Cohn-Faktion III noch vor der Octansäure-Behandlung mit dem Anionenaustauscher behandelt, während das erfindungsgemäße Verfahren diesen Verfahrensschritt erst nach der Behandlung der Immunglobulinlösung mit Octansäure und Aktivkohle durchführt, um sicherzustellen, daß während der Aufarbeitung der Cohn-Faktion III auftretende proteolytische Aktivitäten sicher entfernt werden.

Aufgabe der EP 0 013 901 war es, aus einer IgG-, IgA- und IgM-haltigen Proteinfraktion (Cohn-Faktion III) eine intravenös applizierbare Lösung dieser Proteine herzustellen. Dafür war die Verwendung von β -Propiolacton zur Reduzierung der antikomplementären Aktivität in dem Ausgangsmaterial notwendig. Überraschenderweise konnte nur gezeigt werden, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren die antikomplementäre Aktivität der Ausgangsfraktion bereits so deutlich verbessert wurde, daß auch andere zur Sterilisation von Blutprodukten geeignete Substanzen, wie z.B. Tri-N-Butylphosphat, anstelle von β -Propiolacton verwendet werden können. Die Werte der antikomplementären Aktivität (ACA) und der in vivo-Verträglichkeit der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Präparate und von Vergleichspräparaten sind in Tab. IV (Anhang) zusammengestellt.

Zur Bestimmung der antikomplementären Aktivität der Immunglobuline wurde eine definierte Menge des Prüfproduktes mit einer definierten Menge von Meerschweinchen-Komplement inkubiert und die verbleibende Menge Komplement wurde titriert. Die ACA wurde als Verbrauch der CH-50 pro g Immunglobulin angegeben. Die Methode zur Bestimmung der ACA entsprach weitgehend der von M. Mayer publizierten Methode (Mayer, M.M. (1961). Complement and complement fixation. In: Experimental Immunoochemistry, 2nd edn., pp 133-240, C. Thomas, Springfield, II.).

Als Richtwert für intravenös anwendbare IgG-Produkte gilt eine antikomplementäre Aktivität (ACA) von \leq 1500 CH 50 pro g Protein. Die Cohn-Faktion III zeigt ACA-Werte von $>$ 1500 CH 50/g Protein und ist erfahrungsgemäß intravenös unverträglich.

Das IgM-haltige Produkt der EP 0 013 901 weist eine ACA von 300 CH 50/g auf und ist erfahrungsgemäß bei der intravenösen Anwendung gut verträglich. Ein in vivo Modell zur Prüfung der i.v. Verträglichkeit ist das Rattenmodell nach Bleeker et al. (W. K. Bleeker, J. Agterberg, G. Righter, A. de Vries van Rossen, J. C. Bakker: An animal model for the detection of hypotensive side effects of immunoglobulin preparations. Vox Sang. 52: 281-290 (1987)).

Verträglichkeitsparameter für die Immunglobuline in diesem Modell ist der Blutdruck. Intravenös unverträgliche Präparate führen zu einer deutlichen Blutdrucksenkung. Der Vergleich nicht intravenös verträglicher Präparate, dies sind i.m. (intramuskulär) anwendbare Präparate, mit dem Produkt der EP 0 013 901 und dem erfindungsgemäßen Produkt des Beispiels 1 und 2 zeigt, daß die erfindungsgemäß hergestellten Produkte zu einem Blutdruckabfall an der Ratte führen (s. Tab. IV), der deutlich geringer ist als der von i.m. Produkten.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

50 Beispiel 1

Pro kg Paste Cohn-Faktion III wurden 3 kg destilliertes Wasser gegeben. Die Produkttemperatur wurde auf 4 °C abgekühlt. Pro 1 kg dest H₂O wurden 0.0055 kg Na-acetat x 3 H₂O zugegeben. Durch Zugabe von 96 %iger Essigsäure wurde der pH-Wert auf pH 5.05 eingestellt. Jeweils 50 kg Paste wurden in 120 l Pufferlösung bei + 4 °C suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 96 %iger Essigsäure auf pH 5.05 eingestellt. Durch Zentrifugation mit einer Cepa-Zentrifuge wurde der Niederschlag abgetrennt. Die vom Niederschlag abgetrennte Lösung wurde auf + 25 °C erwärmt. Pro kg Überstand wurden 25 ml Octansäure zugegeben. Die Zugabe der Octansäure erfolgte über Tropftrichter. Der pH-Wert der Lösung

wurde auf 4.8 eingestellt und der Ansatz für 1 Stunde bei + 20 °C belassen. Pro kg des Ansatzes wurden 4 g Tricalciumphosphat zugegeben und der Ansatz für 45 Minuten bei 20 °C belassen, bevor die Suspension zur Entfernung des Niederschlages zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation filtriert und anschließend ultrafiltriert. Die gegen Acetatpuffer ultrafiltrierte Lösung wurde auf einen Proteinwert von 5 % und einen pH-Wert von 6.7 eingestellt. Pro kg dieser Lösung wurden 5 g Aktivkohle unter langsamem Rühren, bei Raumtemperatur gegeben. Die Adsorptionszeit betrug 1 Stunde. Anschließend wurde die Aktivkohle abzentrifugiert und der Überstand filtriert. Zu der filtrierten Lösung wurde in 0.08 M Na-Acetat-Lösung gequollenes DEAE-Sephadex A-50 in einer Menge von 40 mg pro g Protein gegeben. Die Sephadex-Adsorption erfolgte bei pH 6.5. Nach Abtrennung des Sephadex wurde der Proteingehalt des Eluats auf 40 g/l eingestellt und pro 1 l Überstand 1.40 ml β-Propiolacton unter pH-Konstanz von pH 0.8 - 8.1 zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 N NaOH konstant gehalten. Nach der β-Propiolacton-Behandlung wurde die Lösung sterilfiltriert. Die sterilfiltrierte Lösung wurde zur Einstellung der Ionenkonzentration und des Proteinwertes ultra- und diafiltriert. Diese Lösung wurde sterilfiltriert und in 1-Liter-leersterile Flaschen abgefüllt.

15

Beispiel 2

Ausgangsmaterial war, wie in Beispiel 1 beschrieben, die Cohn-Faktion III, die pro 50 kg Paste in 120 l Pufferlösung, bei + 4 °C suspendiert wurde. Der pH-Wert wurde mit 96 %iger Essigsäure auf pH 5.05 eingestellt. Pro kg der Suspension wurden 40 ml Octansäure über einen Tropftrichter bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließend wurde für 15 Minuten gerührt und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf pH 5.05 eingestellt. Pro kg des Ansatzes wurden anschließend 4 g Tricalciumphosphat zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde, unter Rühren, bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde, wie in Beispiel 1 aufgeführt, ultrafiltriert, mit Aktivkohle, DEAE-Sephadex A-50 und β-Propiolacton behandelt, bevor die Lösung ultrafiltriert, sterilfiltriert und abgefüllt wurde.

30

Ausgangsmaterial war, wie in Beispiel 1 beschrieben, die Cohn-Faktion III, die pro 50 kg Paste in 120 l Pufferlösung, bei + 4 °C suspendiert wurde. Die Octansäurebehandlung und Calciumphosphat-Adsorption wurde, wie unter Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt. Der nach der Zentrifugation filtrierte Überstand wurde mit dem Polyoxyethylenderivat Tween® 80 in einer Konzentration von 1% versetzt und 15 Minuten später wurde Tri-N-Butylphosphat bis zu einer Konzentration von 0.3 % zugegeben. Der Ansatz wurde für 8 Stunden, bei + 25 °C gerührt. Anschließend wurde 5 % Sojabohnenöl dazugegeben, 30 Minuten nach dem Rühren die wässrige Phase von der Ölphase dekantiert und die wässrige Lösung gegen Acetatpuffer ultrafiltriert. Der Proteinwert wurde auf 5 % eingestellt und der pH-Wert auf 6.7. Pro kg dieser Lösung wurden 5 g Aktivkohle unter langsamem Rühren, bei Raumtemperatur gegeben. Die Adsorptionszeit betrug 1 Stunde. Anschließend wurde die Aktivkohle abzentrifugiert und der Überstand filtriert. Zu der filtrierten Lösung wurde in 0.08 M Na-Acetat-Lösung gequollenes DEAE-Sephadex A-50 in einer Menge von 40 mg pro g Protein gegeben. Die Sephadex-Adsorption erfolgte bei pH 6.5. Nach Abtrennung des Sephadex wurde die Lösung zur Einstellung der Ionenkonzentration und des Proteinwertes ultra- und diafiltriert. Diese Lösung wurde sterilfiltriert und in 1-Liter leersterile Flaschen abgefüllt.

45

Tab. I

Auswirkung der Aerosilmenge auf die Verteilung der IgG-Subklassen polyvalenter Immunglobuline									
Produkt	pH	Protein	IgG	Gesamtlipide	IgG-1	2	3	4	Verteilung in %
		g/l	g/l	mg/dl					
RGB-810	7.05	35.6	31.36	158	69.1	21.2	5.4	4.3	
▪ + 0.5 AE	6.89	34.7	30.15	28	70.8	22.1	2.7	4.4	
▪ + 1.0 AE	6.78	32.4	28.72	7	73.1	22.3	0.3	4.2	

EP 0 413 187 A1

Tab. II

Auswirkung der Aerosilmenge auf die Verteilung der IgG-Subklassen in Serumproteinlösungen								
Produkt	pH	Protein	IgG	Gesamtlipide	IgG-1	2	3	4
		g/l	mg/dl	Verteilung in %				
RPCS 642	7.47	5.25	6.98	351	66.9	23.0	3.1	7.0
" + 0.5 % AE	7.65	52.3	7.51	51	65.7	22.7	3.5	8.1
" + 1.0 % AE	7.64	50.9	7.51	47	69.2	20.8	3.0	7.0
" + 2.0 % AE	7.54	48.1	6.95	41	70.7	21.8	0.4	7.1

15

Tab IV

Antikomplementäre Aktivität (ACA) und in vivo Verträglichkeit an der Ratte			
Produkt		ACA/g Protein	Blutdruckänderung in % (n = 8)
IgM-Konzentrat nach Beispiel 1 ohne β -PL		800	- 30
IgM-Konzentrat nach Beispiel 1 mit β -PL		250	- 15
IgM-Konzentrat nach Beispiel 2 ohne β -PL		600	- 20
IgM-Konzentrat nach Beispiel 2 mit β -PL		180	- 15
Referenz-IgG-Präparat (handelsübliches i.v. IgG-Präparat)		80	- 8
IgM-Konzentrat nach EP 0 013 901 (ohne β -PL)		>1500	- 50
IgM-Konzentrat nach EP 0 013 901 (mit β -PL)		300	- 20
Cohn-Faktion III bzw. i.m. Produkt		>1500	- 80

35

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer für die intravenöse Applikation geeigneten Immunglobulinlösung durch Behandlung einer durch Fraktionierung aus Humanblut erhaltenen Proteinfraktion, die die Immunglobuline des Typs IgG, IgA und IgM in ankonzentrierter Form enthält, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) die Proteinfraktion mit Acetatpuffer versetzt,
 - b) mit Calciumphosphat und Octansäure behandelt und
 - c) zentrifugiert wird,
 - d) der Überstand abgetrennt und
 - e) einer DEAE-Sephadex A 50-Adsorption unterworfen und
 - f) die nach Abtrennen des Adsorptionsmittels erhaltene Lösung sterilfiltriert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die im Acetatpuffer unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation entfernt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Überstand vor der Adsorption mit Aktivkohle behandelt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltene Immunglobulinlösung mit β -Propiolacton behandelt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß β -Propiolacton in Mengen von 0,05 bis 0,15 ml pro 100 ml einer 4%igen Immunglobulinlösung verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltene Immunglobulinlösung mit Tri-N-Butylphosphat behandelt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Tri-N-Butylphosphat in Mengen von 0,10 bis 1,0 ml pro 100 ml einer 5%igen Immunglobulinlösung verwendet wird.

Abb. I

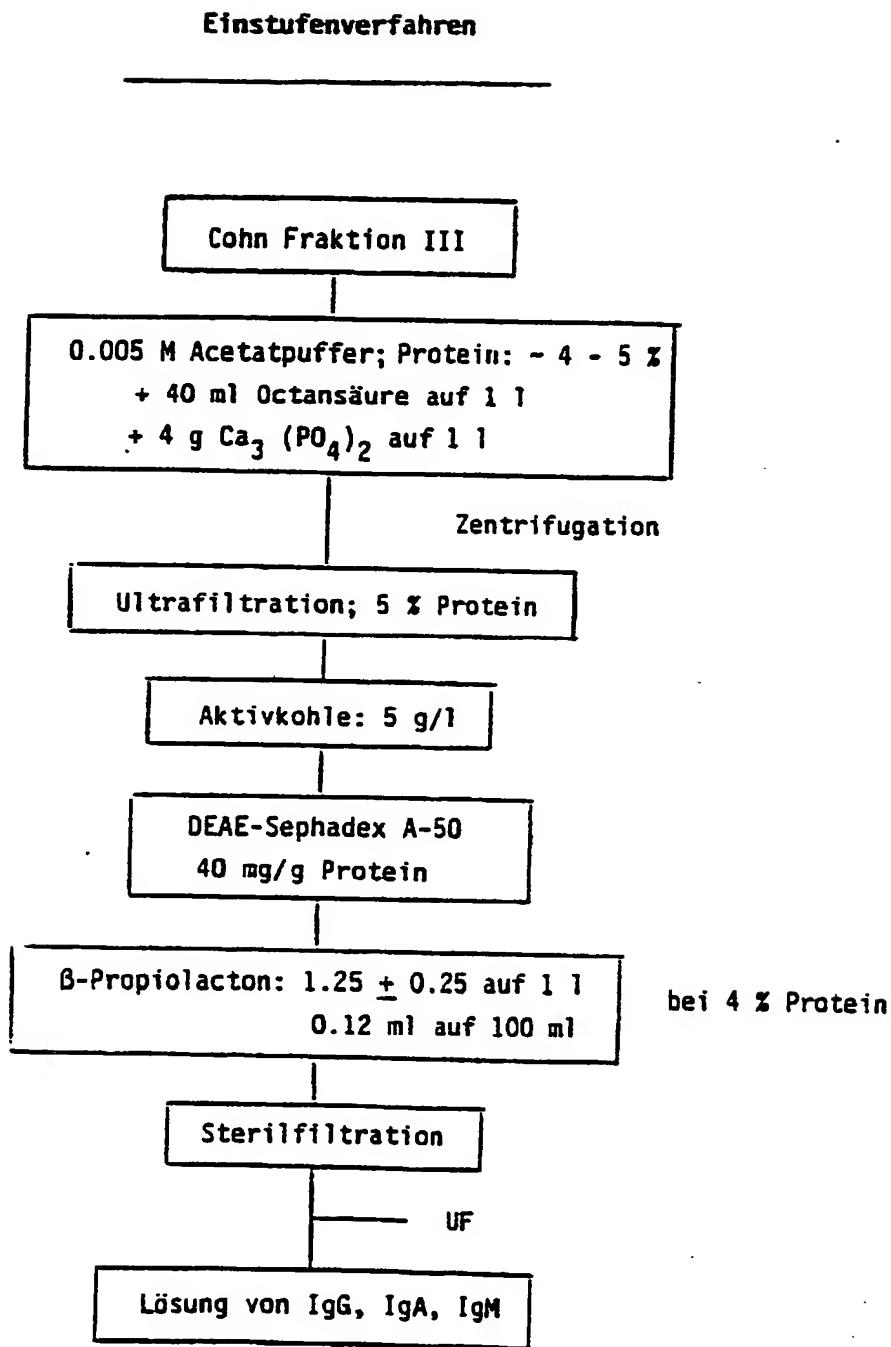
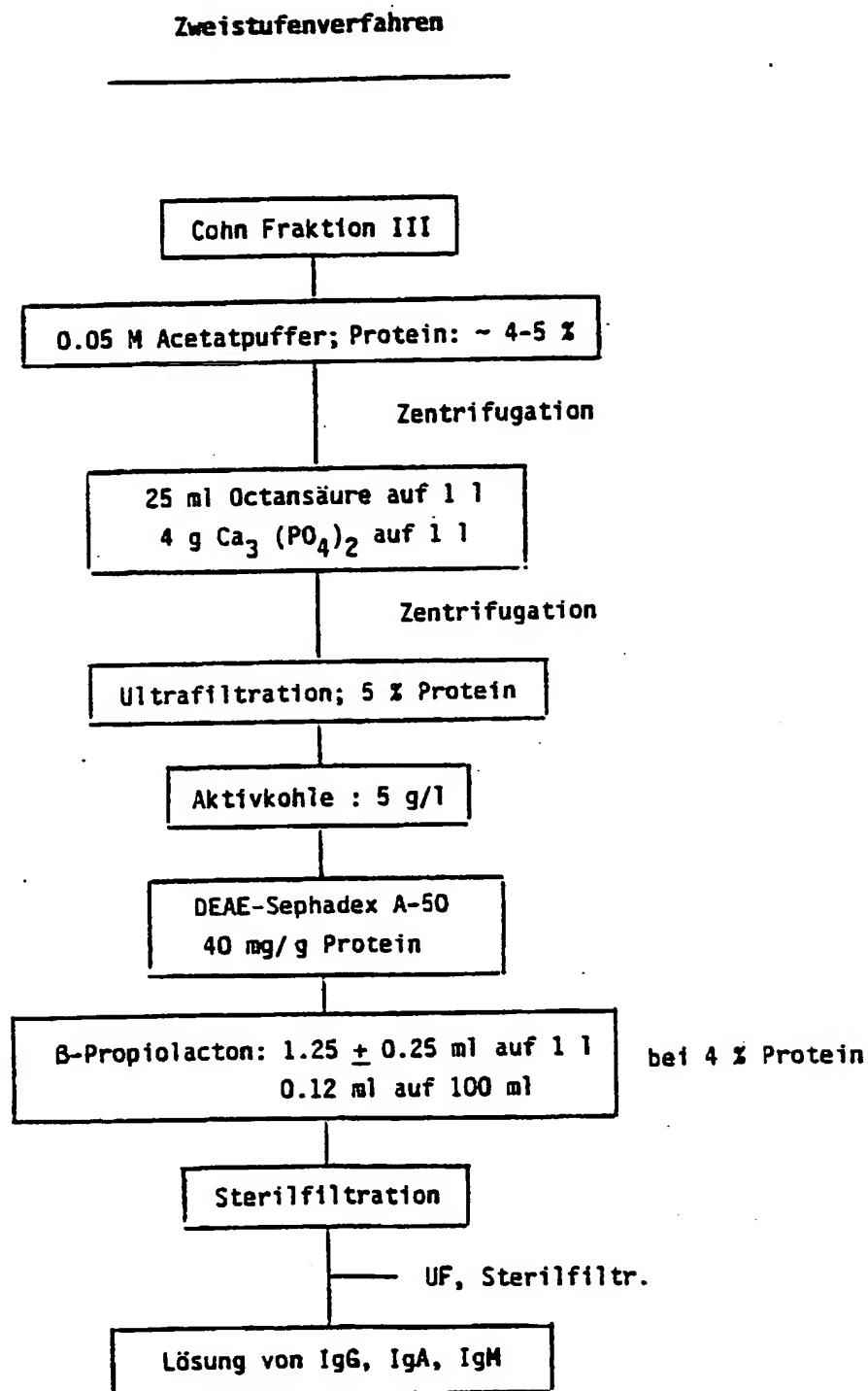


Abb. II





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 11 4575

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrift Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.5)
D, Y	EP-A-0 013 901 (BIOTEST-SERUM-INSTITUT GmbH) * Seite 4, Zeilen 1-23; Ansprüche * ---	1-5	A 61 K 39/395
Y	US-A-3 808 189 (AMERICAN CYANAMID CO.) * Anspruch 3 * ---	1-5	
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Band 9, Nr. 21 (C-263)[1744], 29. Januar 1985; & JP-A-59 170 015 (ASAHI KASEI KOGYO K.K.) 26-09-1984 * Insgesamt * ---	1-5	
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Band 13, Nr. 228 (P-877)[3576], 26. Mai 1989; & JP-A-1 38 657 (MEIDENSHA ELECTRIC MFG CO., LTD) 08-02-1989 * Insgesamt * ---	1-5	
E	EP-A-0 352 500 (BIOTEST PHARMA GmbH) * Seite 3, Zeilen 9-17,29; Beispiel 1; Seite 4, Zeile 15; Seite 6, Zeile 40 * -----	6-7	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. CL.5)</div> A 61 K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	03-09-1990	ALVAREZ Y ALVAREZ C.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorie oder Grundsätze		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelddatum veröffentlicht worden ist		
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offenbarung	L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument		
P : Zwischenliteratur	Ä : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		